ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201711.01422v1

大豆异黄酮对肥胖大鼠肠道瘦素介导 Janus 激酶/信号转导及转录激活因子信号转导通路的影响

李立科[1] 罗启慧[1,2] 唐秀莹[1] 黄 超[1] 陈晓林[1] 刘文涛[1,2] 陈正礼[1,2,*]

(1.四川农业大学动物医学院，实验动物疾病模型研究室，成都 611130；2.四川农业大学动物医学院，实验动物工程技术中心，雅安 625014)

摘 要：本试验旨在研究大豆异黄酮对肥胖大鼠肠道瘦素介导 Janus 激酶(JAK)/信号转导及转录激活因子(STAT)信号转导通路的调控作用，探讨大豆异黄酮对肥胖大鼠的干预机制。选取 80 只 5 周龄 SD 雄性大鼠动物适应环境 1 周后，随机分为基础饲粮组（12 只）和高脂饲粮组（68 只），分别饲喂基础饲粮和高脂饲粮，饲喂 9 周后高脂饲粮组大鼠成功建立食源型肥胖大鼠模型。将 40 只肥胖大鼠随机分为大豆异黄酮干预低、中、高剂量组和肥胖对照组，每组 10 只。低、中、高剂量组大鼠分别灌胃 50、150、450 mg/kg BW 的 SIF 提取物，基础饲粮组和肥胖对照组灌胃不含 SIF 提取物的溶媒剂。大豆异黄酮连续干预肥胖大鼠 5 周，监测大鼠体重，并采用免疫组织化学 SABC 染色法研究大鼠肠道中长型瘦素受体(OB-Rb)、Janus 激酶 2(JAK2)、磷酸化的信号转导与转录激活因子 3(p-STAT3)、细胞因子信号 3 抑制因子(SOCS3)和神经肽 Y(NPY)的表达和分布。结果显示：试验各时期基础饲粮组大鼠体重均极显著低于肥胖对照组(P＜0.01)。SIF 干预 5 周后，与肥胖对照组相比，各 SIF 干预组大鼠体重均下降，并表现出剂量依赖性，其中中、高剂量组极显著低于肥胖对照组(P<0.01)。各组大鼠 OB-Rb、JAK2、p-STAT3、SOCS3 和 NPY 在十二指肠、空肠、回肠、结肠和直肠均有表达；同基础饲粮组相比，肥胖对照组大鼠上述 5 种因子在个肠段的表达量均显著降低(P＜0.05)；大豆异黄酮干预组中 OB-Rb、JAK2、p-STAT3 和 NPY 的表达量在各肠段均较肥胖对照组增多，总体呈现剂量依赖性。由此得出，大豆异黄酮可通过增加肠道中 OB-Rb 的表达，激活 JAK，加速 STAT 的磷酸化，改善能量代谢，减弱肥胖大鼠瘦素抵抗状态，从而起到减重作用。

关键词：大豆异黄酮；免疫组织化学 SABC 染色法；OB-Rb；JAK2；p-STAT3；SOCS3；NPY；肥胖大鼠

中图分类号：S811.2　　　　文献标志码：A　　　　文章编号：

肥胖症是遗传与环境因素共同作用所致的营养代谢障碍性疾病，肥胖者患 II 型糖尿病、血管粥样硬化、高血压、脂肪肝等风险增加[1]。然而，肥胖及相关疾病在亚洲国家发生率较低，这可能和亚洲人饮食中含有较多的大豆以及大豆相关食物有关[2]。研究表明，亚洲人每日异黄酮的摄入量为 25～40 mg，远大于美国人

收稿日期：2016-02-26

基金项目：国家科技支撑计划课题（2014BAI03B01）；国家重大科学仪器设备开发专项（2013YQ49085906）；四川省青年科技创新研究团队项目（2013TD0015）

作者简介：李立科（1990−），男，四川成都人，硕士研究生，从事实验动物疾病模型研究。E-mail：394580507@qq.com

*通信作者，陈正礼，教授，博士生导师，E-mail： chzhli75@163.com

日摄入量[3-4]。大豆异黄酮(soy isoflavone,SIF)是一种植物性雌激素，具有与雌激素相似的分子结构和分子量，能与雌激素受体结合，具弱雌激素样作用。在多个信号通路的作用下，可以减少前脂肪细胞，改善血脂和血糖代谢[5-7]，达到减肥降脂的功效[8]。相关资料证实 SIF 能显著改善机体瘦素(leptin,Lep)水平并调控机体能量代谢[9-10]。Lep 是一种由脂肪细胞分泌并能感知和调节机体自身能量的功能性多肽[11]，主要生理功能是调节摄食和能量输出。Lep 与长型瘦素受体(obese receptor b,OB-Rb)结合后，能够磷酸化激活内源性酪氨酸激酶 Janus 激酶 2(Janus kinase 2,JAK2)分子，活化的 JAK2 能使受体特定部位的酪氨酸残基(Tyr985 和 Tyr1138)磷酸化，其中 p-Tyr1138 是磷酸化的信号转导与转录激活因子 3(phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3,p-STAT3)的锚定位点，p-STAT3 分子被磷酸化后，形成二聚体，进入细胞核内，调节特异的基因转录和蛋白质合成[12-13]，影响膜电位和动作电位发放频率，改变神经递质和神经肽 Y(neuropeptide Y,NPY)的释放，进而达到调节肥胖的作用。而在哺乳动物细胞系中，细胞因子信号 3 抑制因子(suppressor of cytokine signaling 3,SOCS3)过量表达时，通过与 JAK2 分子结合，抑制 Janus 激酶（Janus kinase 2,JAK）所诱导的自身磷酸化和受体磷酸化，能够阻断 Lep 作用。在外周系统中，肠道无疑是 Lep 作用的重要部位。因此，为了研究 SIF 调控肥胖大鼠肠道中 OB-Rb 及 JAK/信号转导与转录激活因子（phosphorylated signal transducer and activator of transcription，STAT）信号转导通路相关因子的变化，探讨 SIF 对肥胖的干预机制，本试验利用免疫组织化学链霉亲和素-生物素-酶复合物（SABC）染色法，检测在不同剂量 SIF 干预下大鼠肠道中 OB-Rb、JAK2、p-STAT3、SOCS3 和 NPY 分布和表达的变化，以期通过 SIF 调节脂质代谢，减弱 Lep 抵抗，改善动物体重。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物

试验动物为 80 只 5 周龄 SD 雄性大鼠，体重为（140±10） g，购自于四川省人民医院实验动物研究所[使用许可证：SCXK(川)2013-15]。

1.1.2 试验物品及试剂

试验大鼠专用基础饲粮、高脂饲粮、垫料均够自四川普莱美生物科技有限公司，试验饲粮组成及营养水平见表 1；SIF 提取物购自西安天丰生物科技有限公司，产品批号 NF-20140806，高效液相色谱法检测 SIF 纯度为 80%；兔抗鼠 OB-Rb、JAK2、p-STAT3、SOCS3、NPY 抗体试剂盒，均购自北京博奥森生物技术有限公司；即用型 SABC-AP 试剂盒、二氨基联苯胺（DAB）显色试剂，均购自武汉博士德生物工程有限公司。

chinaXiv:201711.01422v1

表 1　试验饲粮组成及营养水平(干物质基础)

Table 1　Composition and nutrient levels of experimental diets (DM basis)　%

项目 Items	基础饲粮 Basal diet	高脂饲粮 High fat diet
原料 Ingredients		
玉米淀粉 Corn starch	69.00	59.00
酪蛋白 Casein	20.00	20.000
猪油 Lard	5.00	15.00
麸皮 Wheat bran	1.00	1.00
矿物质预混料 Mineral premix1)	3.50	3.50
维生素预混料 Vitamin premix2)	1.50	1.50
合计 Total	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels3)		
代谢能 ME/(MJ/kg)	9.51	10.89
粗蛋白质 CP	20.60	20.50
粗脂肪 EE	5.01	14.88
纤维素+抗性淀粉 Cellulose+RS	0.68	10.68

1)矿物质预混料为每千克饲粮提供 Mineral premix provided the following per kg of diets:NaCl 4 g，$CaHPO_3$ 13 g，K_2HPO_4 10 g，$MgSO_4$ 5 g，$FeSO_4$ 1 g，$ZnSO_4$ 0.2 g。

2)维生素预混料为每千克饲粮提供 Vitamin premix provided the following per kg of diets:硫胺素 thiamine 100 mg，核黄素 riboflavin 100 mg，泛酸钙 calcium pantothenate 500 mg，烟酸 nicotinic acid 500 mg，吡哆醇 pyridoxine 100 mg，钴胺素 cobalamine 100 mg，生物素 biotin 50 mg，胆碱 choline 4 000 mg，肌醇 inositol 2 000 mg，VC 1 000 mg，VA 10 000 IU，VD_3 4 000 IU，VE 100 mg，VK 20 mg。

3)代谢能为实测值，其余为计算值。ME was a measured value, while the others were calculated values.

1.1.3　试验用具及仪器设备

Leica 冷冻切片机(德国徕卡有限公司)、Nikon50i-BF 荧光生物数码显微镜(日本尼康公司)、江苏捷达 801 形态分析软件(江苏省捷达科技发展有限公司)、超净工作台等。

1.2　试验方法

chinaXiv:201711.01422v1

chinaXiv:201711.01422v1

1.2.1　动物处理

将80只大鼠随机分笼，在昼夜交替的自然光下饲养，自由饮水进食，试验期间室内温度保持在（20±2）℃，湿度保持在 50%~60%。动物适应环境 1 周后，随机抓取大鼠分为基础饲粮组（12 只）和高脂饲粮组（68 只），分别饲喂基础饲粮和高脂饲粮。饲喂 9 周后，将高脂饲粮组体重大于基础饲粮组大鼠平均体重加 1.4 倍标准差的大鼠选出（共 40 只），并随机分为 4 组，即 SIF 干预低、中、高剂量组和肥胖对照组，每组 10 只。SIF 干预低、中、高剂量组大鼠分别灌胃低、中、高剂量(50、150、450 mg/kg BW)的 SIF 提取物，SIF 提取物用 0.5%羧甲基钎维素钠溶液溶解，基础饲粮组和肥胖对照组大鼠灌胃不含 SIF 提取物的 0.5%羧甲基钎维素钠溶液，各组大鼠均按照 2 mL/kg BW 的灌注量进行灌胃。SIF 干预 5 周，记录每周各组大鼠的体重变化。试验中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。

1.2.2　取材和切片

13 周末将大鼠用 4%戊巴比妥腹腔注射麻醉后全部处死，迅速分离出各肠段，于 4%多聚甲醛溶液进行固定。将固定的组织流水冲洗过夜后，依次梯度酒精脱水、石蜡包埋、切片(厚 4~5 μm)、烘片后备用。

1.2.3　样品染色与分析

每只大鼠选取常规石蜡切片 5 张，进行苏木精-伊红（HE）染色，光学显微镜下观察组织结构。

取每只大鼠肠道组织常规石蜡切片，进行免疫组织化学 SABC 染色后检测 *OB-Rb*、*JAK*2、*p-STAT*3、*SOCS*3、*NPY* 的分布与表达。免疫组织化学 SABC 染色步骤：常规石蜡切片脱蜡后，将切片侵入浓度为 3%新鲜配制的过氧化氢（H_2O_2）中避光反应 30 min，然后用磷酸盐缓冲液（PBS）洗 3 次，95 ℃抗原修复 15 min，10%山羊血清 37 ℃封闭 30 min，PBS 洗 3 次，PBS 稀释一抗 4 ℃过夜(稀释比例均为 1:200)，阴性对照不加一抗，PBS 洗 3 次，PBS 稀释二抗 1 h(稀释比例均为 1:100)，PBS 洗 3 次后滴加 SABC 37 ℃孵育 20 min，PBS 洗 4 次后 DAB 显色，镜下控制反应时间，双蒸水终止显色后双蒸水洗 4 次，最后脱水、透明、封片、镜检。试验均设阴性对照。

1.2.4　图像采集以及数据处理

用光学显微镜观察组织切片，用 Nikon50i-BF 荧光生物数码显微镜进行照相，每个组织选择 5 张切片，每张片子随机选择 5 个视野进行图像采集。在光镜 200 倍视野面积(4 000 μm^2)内测定肠道各因子的阳性表达面积和平均光密度。比较不同组间的阳性表达面积、平均光密度。用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。柱状图数据以平均值±标准差（$\bar{x}$ ±SD）表示，P<0.05 表示差异显著。

2　结果与分析

chinaXiv:201711.01422v1

2.1　肥胖大鼠模型的建立

从第 4 周开始，高脂饲粮组大鼠的体重开始大于基础饲料组大鼠。到第 8 周末，高脂饲粮组大鼠的平均体重大于基础饲粮组大鼠的平均体重±1.4 标准差，达到肥胖大鼠判定标准[14]，表明高脂饲粮诱导的大鼠肥胖模型建立成功。

2.2　SIF 对膳食诱导肥胖大鼠体重的影响

从表 2 可知，在 SIF 干预试验初期（第 9 周），SIF 干预组（低、中、高剂量组）大鼠的体重与肥胖对照组无显著差异（P>0.05）。试验各时期基础饲粮组大鼠体重均极显著低于肥胖对照组(P＜0.01)。随着时间的推移，各 SIF 干预组大鼠体重的增长幅度明显低于肥胖对照组。SIF 干预 5 周后（第 13 周），与肥胖对照组相比，各 SIF 干预组大鼠体重均下降，并表现出剂量依赖性，其中中、高剂量组极显著低于肥胖对照组(P<0.01)。

表 2　大豆异黄酮干预各时期大鼠体重

Table 2　Body weight of rats at each period of administration of SIF　　g

时间 Time	组别 Groups				
	肥胖对照 Obesity control	低剂量 Low dosage	中剂量 Middle dosage	高剂量 High dosage	基础饲粮 Basal diet
第 9 周 Week 9	363.00±6.43	366.11±6.11	361.22±3.66	364.90±4.41	273.00±5.37**
第 10 周 Week 10	385.00±8.61	384.25±6.36	370.98±3.49**	367.29±5.14*	292.45±6.42**
第 11 周 Week 11	405.67±11.57	397.56±6.06	378.71±3.93**	373.50±3.57**	294.89±10.33**
第 12 周 Week 12	420.86±12.50	414.33±6.60	390.00±4.58**	370.33±9.05**	306.87±6.82**
第 13 周 Week 13	437.57±14.71	432.33±6.64	399.63±5.19**	372.87±8.54**	322.83±6.90**

*、**分别表示与肥胖对照组相比具显著（P<0.05）和极显著差异（P<0.01）。

* and ** mean significant difference （P<0.05） and extremely significant difference compared with obesity control group （P<0.01）, respectively.

2.2　HE 染色结果

HE 染色后，光学显微镜下观察发现各组大鼠各肠道组织结构清晰，细胞核染色鲜艳，组织切片完整均匀，各组均没有明显异常病理变化(图 1)。

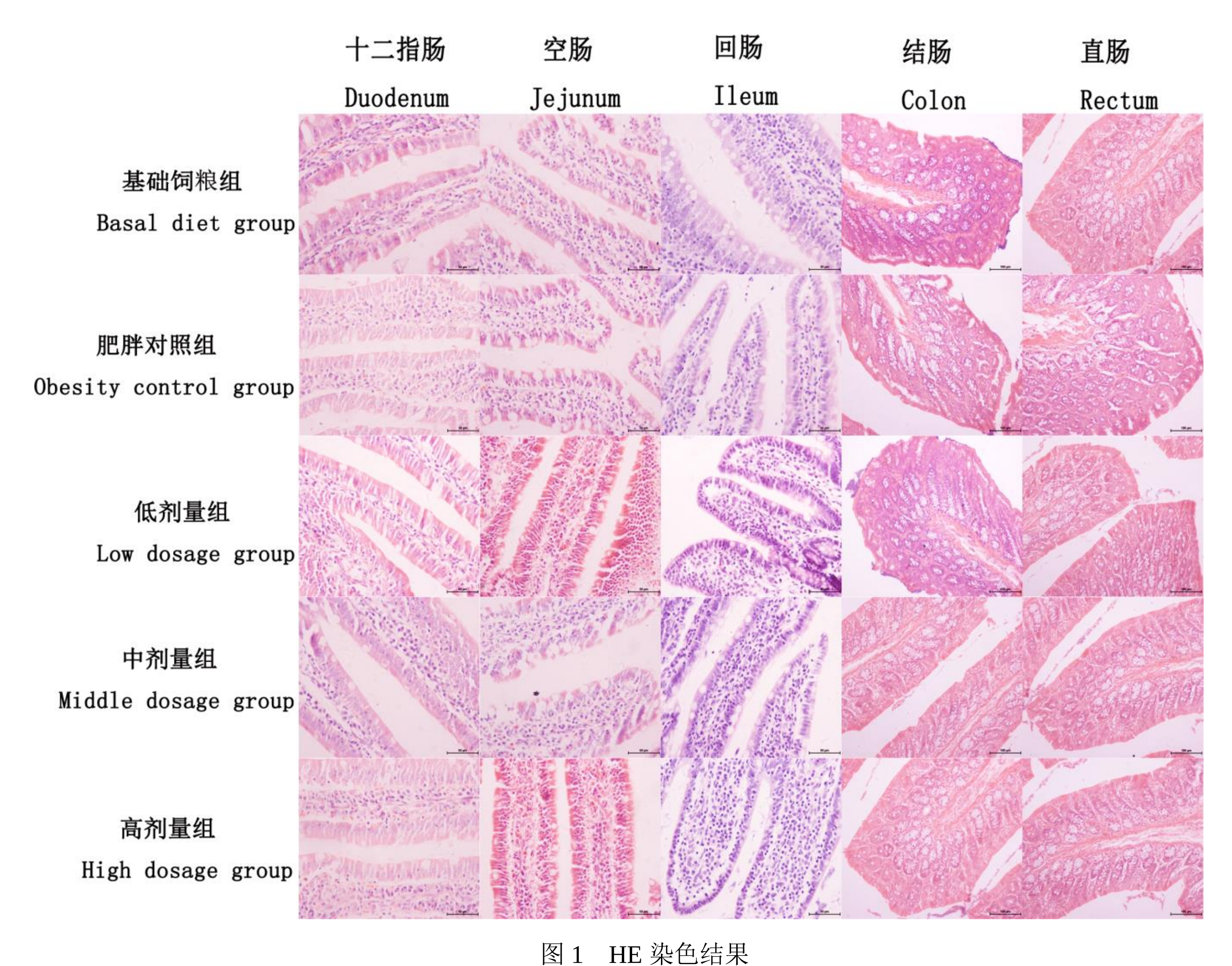


图 1　HE 染色结果

Fig.1　The results of HE staining　（400×）

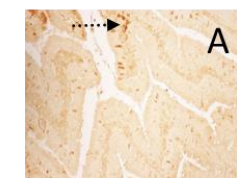
2.3　免疫组织化学 SABC 染色结果

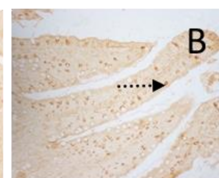
2.3.1　OB-Rb 在肠道中的表达

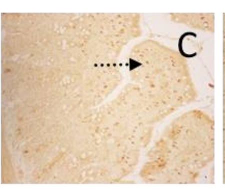
光学显微镜下对切片进行观察发现，OB-Rb 表达阳性细胞呈现黄褐色，OB-Rb 阳性物质多表达于胞质中(图 2，因各组大鼠表现一致，本文仅展示了中剂量组)，肠道从外至内的各层组织中以黏膜层中的固有层表达最为丰富，尤以十二指肠较明显。

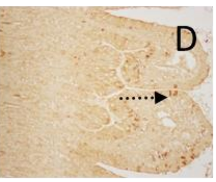
如图 3-A 所示，基础饲粮组大鼠 OB-Rb 在各肠段中的表达量均显著高于肥胖对照组(P＜0.05)。OB-Rb 的表达量在十二指肠和直肠中表现为随 SIF 剂量的增加而显著增加(P＜0.05)；在空肠和回肠中表现为高剂量组显著高于中、低剂量组(P＜0.05)；而结肠中则表现为高、中剂量组显著高于低剂量组(P＜0.05)。

chinaXiv:201711.01422v1









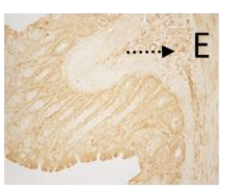


图 2　*OB-Rb* 在十二指肠（A）、空肠（B）、回肠（C）、结肠（D）、直肠（E）中的分布

Fig.2　The distribution of *OB-Rb* in duodenum （A）, jejunum （B）, ileum （C）, colon (D) and rectum (E)（200×）

Ⅰ：肥胖对照组；Ⅱ：低剂量组；Ⅲ：中剂量组；Ⅳ：高剂量组；Ⅴ：基础饲粮组。同部位数据柱标注相同字母表示差异不显著(P＞0.05)，不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

Note：Ⅰ: Obesity control group; Ⅱ: Low dosage group; Ⅲ: Middle dosage group; Ⅳ: High dosage group; Ⅴ: Basal diet group. In

chinaXiv:201711.01422v1

the same part, data columns with same small letters mean no difference ($P>0.05$), and different small letters means significant difference （$P<0.05$）.

图 3 大豆异黄酮对大鼠十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠中 *OB-Rb*、*JAK*2、*p-STAT*3、*SOCS*3、*NPY* 表达的影响

Fig.3 Effects of SIF on *OB-Rb*, *JAK*2, *p-STAT*3, *SOCS*3 and *NPY* expression in duodenum, jejunum, ileum, colon and rectum of rats

2.3.2 JAK2 在肠道中的表达

光学显微镜下观察发现，整个肠道中均有 JAK2 的表达(图 4，因各组大鼠表现一致，本文仅展示了中剂量组)，*JAK*2 阳性反应呈棕褐色或棕黄色。*JAK*2 在肠道各段阳性表达于肠腺、肠绒毛上，黏膜下层也有表达。

如图 3-B 所示，基础饲粮组大鼠 JAK2 在各肠段中的表达量均显著高于肥胖对照组($P<0.05$)。JAK2 在的表达量在十二指肠中表现为低、中剂量组显著高于高剂量组($P<0.05$)；在空肠中表现为高剂量组显著高于中、低剂量组($P<0.05$)；在回肠、结肠和直肠中则表现为随 SIF 剂量的增加而显著增加($P<0.05$)。

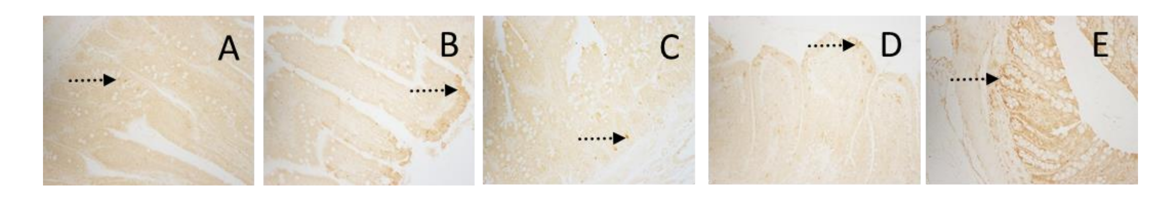


图 4 *JAK*2 在十二指肠（A）、空肠（B）、回肠（C）、结肠（D）、直肠（E）中的分布

Fig.4 The distribution of *JAK*2 in duodenum （A）, jejunum （B）, ileum （C）, colon (D) and rectum (E)（200×）

2.3.3 p-STAT3 在肠道中的表达

光学显微镜下观察发现，p-STAT3 阳性反应的细胞体呈棕褐色或棕黄色(图 5，因各组大鼠表现一致，本文仅展示了中剂量组)。对整个肠道进行观察，发现肠道各段均有 p-STAT3 的表达，且肠道各段阳性产物表达多分布于肠腺、肠绒毛、黏膜下层上。

如图 3-C 所示，除空肠外，基础饲粮组大鼠 p-STAT3 在各肠段中的表达量均显著高于肥胖对照组($P<0.05$)。p-STAT3 的表达量在十二指肠中表现为低剂量组显著高于中、高剂量组($P<0.05$)；在空肠表现为中剂量组显著高于低、高剂量组($P<0.05$)，低剂量组显著高于高剂量组($P<0.05$)；在回肠表现为中、高剂量组显著高于低剂量组($P<0.05$)；在结肠表现为高剂量组显著高于低、中剂量组($P<0.05$)，低剂量组显著高于中剂量组($P<0.05$)；而在直肠则表现为随 SIF 剂量的增加而显著增加($P<0.05$)。

chinaXiv:201711.01422v1

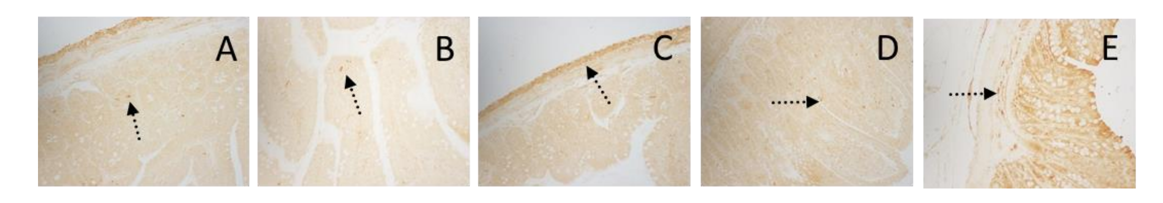


图 5　*p-STAT3* 在十二指肠（A）、空肠（B）、回肠（C）、结肠（D）、直肠（E）中的分布

Fig.5　The distribution of *p-STAT3* in duodenum （A）, jejunum （B）, ileum （C）, colon (D) and rectum (E) （200×）

2.3.4　SOCS3 在肠道中的表达

光学显微镜下观察发现，SOCS3 阳性染色呈棕褐色或棕黄色，主要定位于细胞质(图 6，因各组大鼠表现一致，本文仅展示了中剂量组)。在整个肠道中均有 SOCS3 阳性表达产物，阳性产物集中表达在黏膜层中的固有层。

如图 3-D 所示，基础饲粮组大鼠 SOCS3 在各肠段中的表达量均显著高于肥胖对照组($P<0.05$)。SOCS3 的表达量在十二指肠中表现为高、中剂量组显著高于低剂量组($P<0.05$)；在空肠中表现为低、中剂量组显著高于高剂量组($P<0.05$)；在回肠中表现为低剂量组显著高于中、高剂量组($P<0.05$)；在结肠中表现为低、中剂量组显著高于高剂量组($P<0.05$)；在直肠中表现为高剂量组显著高于低、中剂量组($P<0.05$)。

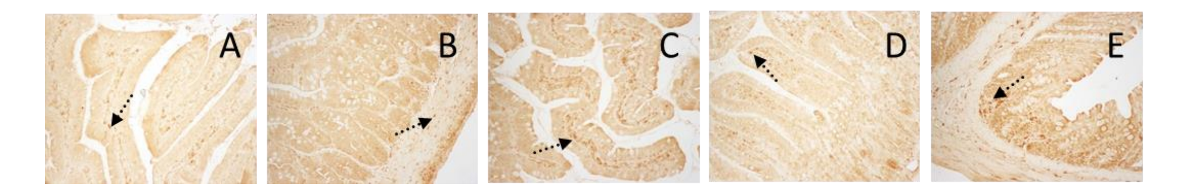


图 6　SOCS3 在十二指肠（A）、空肠（B）、回肠（C）、结肠（D）、直肠（E）中的分布

Fig.6　The distribution of SOCS3 in duodenum （A）, jejunum （B）, ileum （C）, colon (D) and rectum (E) （200×）

2.3.5　NPY 在肠道中的表达

光学显微镜下观察发现，NPY 阳性反应呈棕褐色或棕黄色(图 7，因各组大鼠表现一致，本文仅展示了中剂量组)。在各肠道的浆膜至黏膜下层以及十二直肠区域均有粗大的 NPY 阳性神经纤维，而在回肠区域 NPY 阳性神经纤维开始减少。NPY 阳性神经纤维分布密度与神经丛的分布可能直接相关，存在小血管的地方几乎都有 NPY 阳性神经纤维的伴行。

如图 3-E 所示，基础饲粮组大鼠 NPY 在各肠段中的表达量均显著高于肥胖对照组($P<0.05$)。NPY 的表达量在十二指肠和结肠中表现为高剂量组显著高于中、低剂量组($P<0.05$)；在空肠、回肠和直肠中则表现为随 SIF 剂量的增加而显著增加($P<0.05$)。

chinaXiv:201711.01422v1

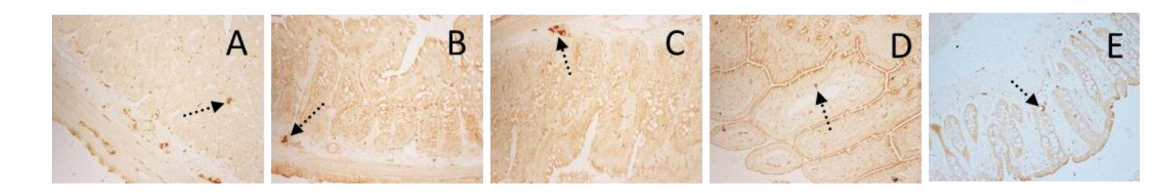


图 7　NPY 在十二指肠（A）、空肠（B）、回肠（C）、结肠（D）、直肠（E）中的分布

Fig.7　The distribution of NPY in duodenum （A）, jejunum （B）, ileum （C）, colon (D) and rectum (E)（200×）

3　讨　论

3.1　SIF 对膳食诱导肥胖大鼠体重的影响

近年来，肥胖及相关疾病的患病率迅速增加，尤以西方国家更为明显，肥胖已成为危害公共健康的一个风险因素，因此如何有效减轻或防止肥胖具有重要意义。本研究中 SIF 干预后可显著降低肥胖大鼠的体重，这与 Ali 等[9]、Ørgaard 等[15]研究结果相一致，肥胖大鼠体重随 SIF 剂量增加而降低，表明 SIF 具有减重作用并呈剂量依赖性。研究表明，SIF 可显著降低甘油三酯、总胆固醇以及低密度脂蛋白，同时提高高密度脂蛋白含量以及低密度脂蛋白和高密度脂蛋白的比值[15-16]。因此，在畜牧业应用中，可将 SIF 作为一种饲料添加剂，通过抑制脂肪细胞分化[17]，缩小脂肪细胞面积[18]，减少脂肪沉积[19]，降低 Lep 抵抗，从而改善动物肥胖状态。

3.2　SIF 对肥胖大鼠肠道 OB-Rb、JAK2、p-STAT3、SOCS3 和 NPY 表达的影响

El-Haschimi 等[20]调查发现，大多数肥胖患者血清 Lep 水平显著高于正常人群，称作高 Lep 血症，但高水平的血清 Lep 并未使患者体重减轻，提示发生 Lep 抵抗，并推断这种抵抗是肥胖的根本原因。目前认为 Lep 抵抗涉及中枢和外周抵抗 2 种机制[21-25]。数据显示，在饮食诱导肥胖中，Lep 抵抗主要发生在血脑屏障缺陷和受体信号转导通路缺陷 2 个环节[26]。

本试验结果表明，在 SIF 干预的肥胖大鼠肠道中，OB-Rb、JAK2、p-STAT3、SOCS3 以及 NPY 均有表达，这与 Cammisotto 等[26]的研究相一致。研究显示 SIF 是一种相对较强的雌激素受体激动剂，具有潜在的减少前脂肪细胞的作用，其发挥肥胖逆转作用与 Lep 有关[27]，因为脂肪组织是 Lep 的主要来源，Lep 能够穿过血脑屏障为大脑提供机体脂肪储备信息，并进行负反馈调节[28]，同时脂肪也会干扰 Lep、OB-Rb 以及 NPY。作为 Lep 的主要功能受体，OB-Rb 在中枢和外周系统均有分布，但主要分布在下丘脑[29]，其主要作用是控制饱腹感、能量消耗以及其他神经内分泌功能[30]。JAK/STAT 是 Lep 生物学作用的主要信号通路[31]，在啮齿类动物上，下丘脑 STAT 磷酸化和 STAT 转录结合的水平常被作为 Lep 的信号标记。本研究发现，在

chinaXiv:201711.01422v1

高脂饲粮诱导的肥胖对照组大鼠的各肠段中，OB-Rb、JAK2、p-STAT3 以及 NPY 的表达量均显著低于基础饲粮组，这可能与肥胖大鼠脂肪的增加密切相关，由于 Lep 是由脂肪细胞分泌并感知和调节机体自身能量的功能性多肽，随着体内脂肪含量的增加，Lep 分泌加速，从而激活 JAK/STAT 信号通路对脂肪进行负反馈调节。SIF 干预肥胖大鼠后肠道 OB-Rb 表达增加，加快了 JAK2 的活化以及 STAT 的磷酸化，从而抑制肠道消化液分泌及物质吸收，减弱 Lep 抵抗，由此产生抑食和减重效应。SOCS3 诱导 Lep 抵抗的作用已被广泛研究，现已证实，SOCS3 在脑中特异性的缺乏能在一定程度上抑制肥胖[32-34]。本试验中 *SOCS3* 在各肠段表达不一致，不同剂量间差异不明显，说明 SOCS3 作为 Lep 的负性调节因子，在肠道中抑制 JAK/STAT 的信号通路作用不显著，从而在一定程度上减弱了 Lep 抵抗作用，缓解了肥胖症状。NPY 作为一种食欲刺激神经肽，在食物摄入和能量消耗调节中起着重要的作用，其过度表达会诱导大鼠体重增加[35]。在本试验中，OB-Rb 表达量的升高并没有抑制 NPY 这种促食肽的表达，其反而呈现剂量依赖性的增加，但并没有导致体重的增加。究其原因，虽然 *NPY* 表达增加，但作用效果可能不如 OB-Rb 介导 JAK/STAT 信号通路对肠道消化吸收的调节。然而 Ob-Rb 是否参与 SIF 的调节作用，OB-Rb、JAK2、p-STAT3、SOCS3 以及 NPY 在肠道是否存在相互作用，还需更细致和深入的试验来探寻。

4 结 论

① SIF 可增加肠道 *OB-Rb* 的表达，激发 JAK/STAT 信号转导通路，改善能量代谢，减弱肥胖大鼠 Lep 抵抗状态。

② SIF 对膳食诱导的肥胖大鼠具有减重作用，并在 50～450 mg/kg BW 范围内呈现剂量依赖性。

参考文献：

[1] MARQUES M D,SANTOS R D,PARGA J R,et al.Relation between visceral fat and coronary artery disease evaluated by multidetector computed tomography[J].Atherosclerosis,2010,209(2):481–486.

[2] LLANEZA P,GONZÁLEZ C,FERNANDEZ-IÑARREA J,et al.Soy isoflavones,diet and physical exercise modify serum cytokines in healthy obese postmenopausal women[J].Phytomedicine,2011,18(4):245–250.

[3] WAKAI K,EGAMI I,KATO K,et al.Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese[J].Nutrition and Cancer,1999,33(2):139–145.

[4] CHEN Z,ZHENG W,CUSTER L J,et al.Usual dietary consumption of soy foods and its correlation with the excretion rate of isoflavonoids in overnight urine samples among Chinese women in Shanghai[J].Nutrition and Cancer,1999,33(1):82–87.

chinaXiv:201711.01422v1

[5] 朱翠凤,张帆,徐晓燕,等.大豆异黄酮等复合抗氧化剂对 2 型糖尿病患者血脂代谢的影响[J].中国临床康复,2004,8(9):1674–1676.

[6] 毛光明,陈江,夏勇,等.大豆异黄酮对大鼠脂质的影响及减肥作用研究[J].浙江预防医学,2007,19(7):10–11,14.

[7] CEDERROTH C R,VINCIGUERRA M,GJINOVCI A,et al.Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism[J].Diabetes,2008,57(5):1176–1185.

[8] MEZEI O,BANZ W J,STEGER R W,et al.Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese zucker rats and murine RAW 264.7 cells[J].The Journal of Nutrition,2003,133(5):1238–1243.

[9] ALI A A,VELASQUEZ M T,HANSEN C T,et al.Effects of soybean isoflavones,probiotics,and their interactions on lipid metabolism and endocrine system in an animal model of obesity and diabetes[J].The Journal of Nutritional Biochemistry,2004,15(10):583–590.

[10] 龚华芳,张亚兴,王晓东,等.大豆异黄酮对卵巢切除大鼠糖脂代谢和血清瘦素、抵抗素表达的影响[J].暨南大学学报:自然科学版,2011,32(3):324–327,338.

[11] ZHANG Y Y,PROENCA R,MAFFEI M,et al.Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue[J].Nature,1994,372(6505):425–432.

[12] BANKS A S,DAVIS S M,BATES S H,et al.Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor[J].Journal of Biological Chemistry,2000,275(19):14563–14572.

[13] DARNELL J E,Jr.STATs and gene regulation[J].Science,1997,277(5332):1630–1635.

[14] HUANG C,PANG D J,LUO Q H,et al. Soy Isoflavones Regulate Lipid Metabolism through an AKT/mTORC1 Pathway in Diet-Induced Obesity (DIO) Male Rats.[J]. Molecules,2016,21(5):1-13.

[15] ØRGAARD A,JENSEN L.The effects of soy isoflavones on obesity[J].Experimental Biology and Medicine,2008,233(9):1066–1080.

[16] LIN Y,MEIJER G W,VERMEER M A,et al.Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters[J].The Journal of Nutrition,2004,134(1):143–148.

[17] TAXVIG C,SPECHT I O,BOBERG J,et al.Dietary relevant mixtures of phytoestrogens inhibit adipocyte differentiation *in vitro*[J].Food and Chemical Toxicology,2013,55:265–271.

chinaXiv:201711.01422v1

ChinaXiv合作期刊

[18] 罗启慧,刘芸,唐秀莹,等.大豆异黄酮对肥胖大鼠弓状核及垂体 *α-MSH*、*POMC*、*Ob-Rb* 表达的影响[J].华北农学报,2015,30(4):84–89.

[19] NAAZ A,YELLAY S,ZAKROCZYMSKI M A,et al.The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice[J].Endocrinology,2003,114(8):3315–3320.

[20] EL-HASCHIMI K,PIERROZ D D,HILEMAN S M,et al.Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity[J].Journal of Clinical Investigation,2000,105(12):1827–1832.

[21] 翟玲玲,姚兴家,王博,等.瘦素和神经肽 Y mRNA 与肥胖抵抗的关系[J].中国公共卫生,2005,21(3):259–260.

[22] 秦培洁,仝小林.肥胖的瘦素抵抗机制研究进展[J].医学综述,2010,16(5):662–665.

[23] 刘红,胡永华.瘦素受体基因和抵抗素基因与超重和肥胖关系的遗传流行病学研究进展[J].中国慢性病预防与控制,2008,16(5):544–546.

[24] 李晓环,邹宁.瘦素信号转导与瘦素抵抗研究进展[J].中国儿童保健杂志,2009,17(2):179–180,183.

[25] 崔朝辉,马冠生.瘦素抵抗发生机制的研究进展[J].国外医学卫生学分册,2004,31(2):101–104.

[26] CAMMISOTTO P G,RENAUD C,GINGRAS D,et al.Endocrine and exocrine secretion of leptin by the gastric mucosa[J].Journal of Histochemistry & Cytochemistry,2005,53(7):851–860.

[27] BU L H,SETCHELL K D R,LEPHART E D.Influences of dietary soy isoflavones on metabolism but not nociception and stress hormone responses in ovariectomized female rats[J].Reproductive Biology and Endocrinology,2005,3:58.

[28] BRENNAN A M,MANTZOROS C S.Drug insight:the role of leptin in human physiology and pathophysiology-emerging clinical applications[J].Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism,2006,2(6):318–327.

[29] 汪晓洲,马爱群,王军,等.正常大鼠中枢神经瘦素受体的分布[J].中华高血压杂志,2007,15(1):66–69.

[30] ZIGMAN J M,ELMQUIST J K.Minireview:from anorexia to obesity-the yin and yang of body weight control[J].Endocrinology,2003,144(9):3749–3756.

[31] HEGYI K,FÜLÖP K,KOVÁCS K,et al.Leptin-induced signal transduction pathways[J].Cell Biology International,2004,28(3):159–169.

[32] HOWARD J K,CAVE B J,OKSANEN L J,et al.Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3[J].Nature Medicine,2004,10(7):734–738.

chinaXiv:201711.01422v1

[33] MORI H,HANADA R,HANADA T,et al.Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity[J].Nature Medicine,2004,10(7):739–743.

[34] ZAMPIERI T T,RAMOS-LOBO A M,FURIGO I C,et al.SOCS3 deficiency in leptin receptor-expressing cells mitigates the development of pregnancy-induced metabolic changes[J].Molecular Metabolism,2015,4(3):237–245.

[35] MAHMOODI M,GARDINER J V,ASADI KARAM G R,et al.Implantation of fibre encapsulated RIN 1056a cells transfected with NPY cDNA into the lateral ventricle of rats alters body weight[J].Regulatory Peptides,2005,132(1/2/3):80–84.

Effects of Soybean Isoflavone on Signaling Transduction Path of Leptin-Dependent Janus Kinase/Signal Transduction and Activator of Transcription in Intestine of Obese Rats

LI Like[1] LUO Qihui[1,2] TANG Xiuying[1] HUANG Chao[1] CHEN Xiaolin[1] LIU Wentao[1,2] CHEN Zhengli[1,2*]

(1. *Laboratory of Animal Disease Model*, *College of Veterinary Medicine*, *Sichuan Agricultural University*, *Chengdu* 611130, *China*; 2. *Engineering and Technology Center for Laboratory Animals*, *Sichuan Agricultural University*, *Ya'an* 625014, *China*)

chinaXiv:201711.01422v1

Abstract: This study was conducted to study the regulatory effect of signaling transduction path of leptin-dependent Janus kinase (JAK)/signal transduction and activator of transcription (STAT) in intestine of obese rats treated with soybean isoflavone (SIF), and discuss the intervention mechanism of SIF on obese rats. Eighty SD male rats with the age of 5 weeks were randomly divided into basal diet group and high fat diet group after adapt to the environment 1 week, and the rats in basal diet group and high fat diet group were fed with basal diet and high fat diet, respectively. After feeding 9 weeks, the food-induced obese rat models were successfully established in high fat diet group. Forty obese rats were selected to divide into 4 groups which were SIF interfering low, medium and high dose groups and obesity control group, and each group had 10 rats. The rats in low, medium and high dose groups were given 50, 150 and 450 mg/kg BW SIF and the rats in basal diet group and obesity control group were given solvent agent through stomach for 5 weeks. During the experiment, the body weight of rats were measured, and the expression and distribution of obese receptor b (OB-Rb), Janus kinase 2 (JAK2), phosphorylated signal

*Corresponding author, professor, E-mail： chzhli75@163.com (责任编辑 菅景颖)

transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3), suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) and neuropeptide Y (NPY) were detected by immunohistochemical staining of SABC method. The results showed as follows: the body weight of basal diet group was extremely significantly lower than that of obesity control group at each period ($P<0.01$). After 5 weeks of SIF intervention, the body weight of SIF intervention groups was decreased compared with obesity control group and showed a dose-dependence relationship, and the middle and high dose groups was extremely significantly lower than obesity control group ($P<0.01$). OB-Rb, JAK2, p-STAT3, SOCS3 and NPY of rats of each group all existed in duodenum, jejunum, ileum, colon and rectum. Compared with basal diet group, the expression levels of OB-Rb, JAK2, p-STAT3, SOCS3 and NPY at different intestine segments of rats of obesity control group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with obesity control group, the expression levels of OB-Rb, JAK2, p-STAT3 and NPY at different intestine segments of rats of SIF intervention groups were obviously increased, and overall showed a dose-dependence relationship. The results suggest that SIF can increase the expression of intestinal OB-Rb, and activate the JAK, accelerate the STAT phosphorylation, and improve the energy metabolism, attenuate the leptin resistance, and then play a role on weight loss of obese rats.

Key words: soy isoflavones; immunohistochemical staining of SABC method; OB-Rb; JAK2; p-STAT3; SOCS3; NPY; obese rat

chinaXiv:201711.01422v1